

Ret 4

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-147522

(43)Date of publication of application : 02.06.1998

(51)Int.Cl.

A61K 31/195
A61K 31/40
A61K 31/445
// C07D295/08
C07D333/56

(21)Application number : 09-310577

(71)Applicant : PFIZER INC

(22)Date of filing : 12.11.1997

(72)Inventor : AIELLO ROBERT JOSEPH

(30)Priority

Priority number : 96 31275 Priority date : 15.11.1996 Priority country : US

(54) ESTROGEN AGONIST/ANTAGONIST TREATMENT OF ATHEROSCLEROSIS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for treating atherosclerosis regardless of the decrease of lipid.

SOLUTION: The progress of atherogenesis lesion is prevented by administering tamoxifen, 4-hydroxytamoxifen, raloxifene, toremifene, centchroman, idoxifene, 6-(4-hydroxy-phenyl)-5-[4-(2-piperidin-1-ylethoxy) benzyl]-naphthalen-2-ol or [4-[2-(2-aza-bicyclo[2.2.1]hept-2-yl)ethoxyl-phenyl]-[6-hydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-benzo[b]thiophen-3-yl]-methanone, or pharmaceutically acceptable salts thereof in a mammal requiring the treatment of the atherosclerosis, and atherosclerosis is treated by stabilizing plaque regardless of the decrease of lipid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.10.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than withdrawal the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application] 12.10.2001

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-147522

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月2日

(51) IntCl. ⁵	識別記号	F I	
A 6 1 K 31/195	ABX	A 6 1 K 31/195	ABX
31/40		31/40	
31/445	A E D	31/445	A E D
// C 0 7 D 295/08		C 0 7 D 295/08	Z
333/56		333/56	
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 8 頁)			

(21) 出願番号	特願平9-310577	(71) 出願人	390039402 ファイザー・インコーポレイテッド P F I Z E R I N C O R P O R A T E D. アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・10017、 ニュー・ヨーク、イースト・フォーティセ カンド・ストリート・235
(22) 出願日	平成9年(1997)11月12日	(72) 発明者	ロバート・ジョン・アイエロ アメリカ合衆国コネチカット州06385、ウ ォーターフォード、バトラータウン・ロー ド 67
(31) 優先権主張番号	60/031275	(74) 代理人	弁理士 社本 一夫 (外4名)
(32) 優先日	1996年11月15日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

(54) 【発明の名称】 アテローム性動脈硬化症のエストロゲンアゴニスト/アンタゴニスト処置方法

(57) 【要約】

【課題】 脂質の低下とは無関係にアテローム性動脈硬化症を処置する方法を提供する。

【解決手段】 アテローム性動脈硬化症の処置を必要とする哺乳動物において、処置上有効な量のタモキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェン、トレミフェン、センチュロマン、イドキシフェン、6-(4-ヒドロキシフェニル)-5-[4-(2-ピペリジン-1-イルエトキシ)-ベンジル]-ナフタレン-2-オールもしくは{4-[2-(2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-2-イル)-エトキシ]-フェニル}-[6-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシフェニル)-ベンゾ[b]チオフェン-3-イル]-メダノン、またはその薬剤学的に許容しうる塩類の投与によりアテローム発生性病変の進行を阻止し、またはプラークを安定化することによって、脂質の低下とは無関係にアテローム性動脈硬化症を処置する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アテローム性動脈硬化症の処置を必要とする哺乳動物において、処置上有効な量のタモキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェン、トレミフェン、センチュロマン、イドキシフェン、6-(4-ヒドロキシフェニル)-5-[4-(2-ビペリジン-1-イル-エトキシ)-ベンジル]-ナフタレン-2-オールもしくは{4-[2-(2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-2-イル)-エトキシ]-フェニル}-[6-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシフェニル)-ベンゾ[b]チオフェン-3-イル]-メタノン、またはその薬剤学的に許容しうる塩類の投与によりアテローム発生性病変の進行を阻止し、またはプラークを安定化することによって、脂質の低下とは無関係にアテローム性動脈硬化症を処置する方法。

【請求項2】 アテローム発生性病変の進行阻止またはプラークの安定化が、過度の炎症細胞増殖をもたらすケモカイン発現を直接に阻害することにより、または脂質過酸化を阻止することにより行われる、請求項1記載の方法。

【請求項3】 哺乳動物がヒトである、請求項2記載の方法。

【請求項4】 処置上有効な量が約0.01~約200 mg/kg/日である、請求項3記載の方法。

【請求項5】 処置上有効な量が約0.10~約100 mg/kg/日である、請求項4記載の方法。

【請求項6】 化合物が4-ヒドロキシタモキシフェンである、請求項2記載の方法。

【請求項7】 化合物がラロキシフェンである、請求項2記載の方法。

【請求項8】 化合物がトレミフェンである、請求項2記載の方法。

【請求項9】 化合物がセンチュロマンである、請求項2記載の方法。

【請求項10】 化合物がイドキシフェンである、請求項2記載の方法。

【請求項11】 化合物が6-(4-ヒドロキシフェニル)-5-[4-(2-ビペリジン-1-イル-エトキシ)-ベンジル]-ナフタレン-2-オールである、請求項2記載の方法。

【請求項12】 化合物が{4-[2-(2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-2-イル)-エトキシ]-フェニル}-[6-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシフェニル)-ベンゾ[b]チオフェン-3-イル]-メタノンである、請求項2記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトを含めた哺乳動物において特定のエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストを用いてアテローム性動脈硬化症を処置する方法

に関する。

【0002】

【従来の技術】心筋梗塞は西洋諸国における主な死因であり、米国だけでも年間500,000人以上の死者がある。冠状動脈狭窄や病的血管の本数が心臓の病的状態や死のマーカースとして認識されている。不安定なアテローム性動脈硬化プラーク(脱髄帯)の破裂は、心筋梗塞および発作全体の75%近くに及ぶ。しかし血管造影法では将来の閉塞や破裂の部位は予報されない。最近の研究で、冠状動脈疾患の72%はカルシウム沈着した重症の線維症性病変でなく、むしろわずかに狭窄した脂質に富むプラークの破裂によるものであり、血管造影法によっては見えない場合の多いことが示唆された(*Circulation*, 1994; 90:4:2126-2146)。最近の幾つかの研究で、マクロファージ浸潤の増加に伴って、アテローム性動脈硬化病変の細胞外マトリックスが侵食され、病変キャップが脆弱化して、いっそう破裂しやすくなることが示された(*Circulation*, 1994; 90:1669-1678)。制御不能な単球浸潤のため脂質が過度に蓄積し、アテローム性動脈硬化病変の線維性キャップの細胞外破壊が増し、こうして血栓症の引き金となることが示唆された。炎症前応答の阻害薬が過度の単球浸潤を阻止することによりプラークの安定性を高めるであろうということも示唆された。

【0003】Wisemanら, *Biochem. Pharm.* 45, No. 9, 1851(1993)にも、心臓血管の損傷やアテローム性動脈硬化症の発生における脂質過酸化の役割が記載されている。さらにWisemanら, *Cancer Letters* 66, 61(1992)には、ドロロキシフェン(droloxifen)が脂質過酸化を阻害すると記載されている。また米国特許第5,047,431号にはドロロキシフェンをホルモン依存性乳房腫瘍の治療に用いることが開示され、米国特許第5,254,594号にはエストロゲン欠乏により起こる骨疾患の軽減にドロロキシフェンを用いることが開示される。米国特許第5,426,123号には、ドロロキシフェンの脂質低下作用が開示される。

【0004】さらに、Graingerら, *Nature Medicine*, Vol. 1, No. 10(1995年10月)には、タモキシフェンがマウス大動脈の食餌誘発性脂質病変形成を抑制すると開示されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】このように多様な抗アテローム性動脈硬化症療法があるが、この技術分野で他のアテローム性動脈硬化症療法が常に求められ、研究が続けられている。

【0006】

【課題を解決する手段】本発明は、アテローム性動脈硬

化症の処置を必要とする哺乳動物（ヒトを含む）において、アテローム発生性病変の進行を阻止することにより、またはプラークを安定化することにより、脂質の低下とは無関係にアテローム性動脈硬化症を処置する方法を目的とする。好ましくは、このような病変の進行阻止またはプラークの安定化は、処置上有効な量の、下記の特定のエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストの投与によって過度の炎症細胞漸増（recruitment）をもたらすケモカイン（chemokine）発現を直接に阻害することにより達成される。このような病変の進行阻止またはプラークの安定化は、脂質の過酸化を阻止することによっても達成される。

【0007】何らかの理論に固執したくないが、上記の効果（アテローム発生性病変の進行阻止およびプラーク安定化）は、優先的に遺伝子発現の直接制御によって炎症細胞漸増を阻止することにより生じると考えられる。この遺伝子発現の直接制御は、脂質過酸化（これも起きる）の阻止とは区別される。これは、これらの化合物の酸化防止性による脂質酸化防止によって間接的に遺伝子発現を阻害するのではなく、DNAレベルでケモカインを直接に制御するからである。これは、これらの化合物がもつ脂質低下作用とは無関係である。

【0008】好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは、タモキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、ラロキシフェン、トレミフェン、センチュロマン（centchroman）、イドキシフェン（idoxifene）、6-（4-ヒドロキシフェニル）-5-〔4-（2-ピペリジン-1-イル-エトキシ）-ベンジル〕-ナフタレン-2-オールおよび〔4-〔2-（2-アザ-ビシクロ〔2.2.1〕ヘプト-2-イル）-エトキシ〕-フェニル〕-〔6-ヒドロキシ-2-（4-ヒドロキシフェニル）-ベンゾ〔b〕チオフェン-3-イル〕-メタノン、ならびにその薬剤学的に許容しうる塩類である。

【0009】上記方法に好ましい用量は約0.01~200mg/kg/日、好ましくは0.10~100mg/kg/日である。

【0010】病変の進行とは、単球漸増の増大、平滑筋細胞の増殖・移動およびマトリックス合成を伴う成長、ならびに細胞脂質および余分な細胞脂質の蓄積を伴う変性を意味する。

【0011】プラーク安定化とは、脂質コアが成長し、マクロファージの密度増大のため線維性キャップがきわめて薄くかつ破裂しやすくなる段階をプラークが経過するのを阻止することを意味する。

【0012】ケモカインとは、血管壁にみられる内皮細胞、平滑筋細胞およびマクロファージにより産生されるMIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、MCP-1、MCP-2およびMCP-3を含めたC-C（ β ）亜族のケモカインに属する、単球に特異的な化学誘引性

サイトカイン（chemoattractant cytokine）を意味する。

【0013】ケモカイン発現の直接阻止とは、DNAに直接に結合する転写要素または因子と相互作用してその遺伝子の発現を阻止することによる遺伝子発現阻止を意味する。転写の制御はmRNA合成の開始レベルで行われる。

【0014】過度の単球漸増とは、単球が内膜腔へ経内皮移動することによりマクロファージが動脈壁に蓄積する炎症反応を意味する。

【0015】本明細書で用いる“処置”という用語には、防止（たとえば予防）処置および緩和処置が含まれる。

【0016】他の特色および利点は本発明につき記載した本明細書および請求の範囲から明らかであろう。

【0017】本発明化合物はアテローム性動脈硬化プラークの形成（たとえば進行）を阻止し、かつプラークの安定化も助成する。一般に、炎症前ケモカイン（たとえばMCP-1）を含めた幾つかの潜在的分子標的がこの作用を仲介すると考えられる。MCP-1は単球やマクロファージに有効な化学誘引因子である。それは炎症仲介物質、たとえばIL-1および酸化された脂質にตอบสนองして、内皮細胞、血管平滑筋細胞およびマクロファージにより産生および分泌される。

【0018】より具体的には、低密度リポタンパク質（LDL）が反応性酸素種により修飾されて酸化的修飾されたLDL（Ox-LDL）になるのが、アテローム性動脈硬化の開始の中心であると考えられる。プラーク形成しやすい血管壁領域が循環LDLを蓄積する。次いで内皮細胞、平滑筋細胞および/または炎症細胞がLDLをOx-LDLに変換する。その結果、単球にOx-LDLがうっ積して、マクロファージ泡沫細胞を形成する。Ox-LDLその他のリスク因子はマクロファージや他の炎症細胞内の遺伝子を活性化して、炎症細胞が動脈や静脈の血管壁にさらに漸増するのを促進する。本発明化合物は、単球の走化性に関与する単球化学誘引性プロテイン-1（MCP-1）などの遺伝子の転写をmRNA合成レベルで制御することにより、炎症細胞が血管壁内へ漸増してアテローム性動脈硬化プラーク形成を進行させるのを制限すると考えられる。たとえば本発明者らが脂質給餌ApoE KOマウスの分析を行った結果、本発明化合物はアテローム性動脈硬化病変部にみられる高いMCP-1 mRNA濃度を低下させると考えられる。MCP-1 mRNA濃度が低下した結果、単球の移動が有意に変化し、アテローム発生性病変の進行が阻止される。

【0019】本発明化合物は、プラークの安定化をも助成する。すべてのプラークは、アテローム性動脈硬化プラークの発生の初期に、脂質コアが成長して線維性キャップがきわめて薄くかつ破裂しやすくなる段階を経過す

と考えられる。線維性キャップの分解にマクロファージ(プロテアーゼおよびリパーゼを分泌する)が関与することを示す証拠が多数ある。Daviesら(Br. Heart J. 1985; 53: 363-373)

は、破裂したプラーク中のマクロファージの密度が安定なプラークと比較して上昇していると述べている。さらに、プラークの破裂または侵食の部位そのものは、常に炎症過程を特色とする。本発明化合物は、動脈壁内へ単球(たとえば炎症細胞)が漸増(たとえば単球が浸潤)して、アテローム性動脈硬化病変の線維性キャップを破壊するのを阻止することによっても、プラークを安定化する。この単球漸増阻止は、動脈壁内への過度の単球浸潤や泡沫細胞形成をもたらすMCP-1などのケモカインの発現を直接に阻止することにより行われる。

【0020】上記の効果(1. アテローム発生の進行阻止、2. プラークの安定化)は、遺伝子発現の直接制御により炎症細胞の漸増を阻止することによって生じる。この遺伝子発現の直接制御は、脂質過酸化の阻止とは区別される。これは、これらの化合物の酸化防止性による脂質酸化防止によって間接的に遺伝子発現を阻害するのではなく、DNAレベルでケモカインを直接に制御するからである。

【0021】本発明化合物、およびそれらの合成につき記載した参考文献を以下に示す。

【0022】好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストはタモキシフェン(すなわち2-ヒドロキシ-1, 2, 3-プロパントリカルボン酸2-[4-(1, 2-ジフェニル-1-ブテニル)フェノキシ]-N, N-ジメチルエタンアミンおよび(Z)-2-体(1:1))であり、これは米国特許第4, 536, 516号に開示されている(その記載が本明細書に参考として含まれるものとする)。

【0023】関連する他の化合物は4-ヒドロキシタモキシフェン(すなわち2-フェニル部分の4-位にヒドロキシ基があるタモキシフェン)であり、これは米国特許第4, 623, 660号に開示されている(その記載が本明細書に参考として含まれるものとする)。

【0024】好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストはウロキシフェン(すなわち塩酸[6-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシフェニル)ベンゾ[b]チエン-3-イル][4-[2-(1-ピペリジニル)エトキシ]フェニル]メタノン)であり、これは米国特許第4, 418, 068号に開示されている(その記載が本明細書に参考として含まれるものとする)。

【0025】他の好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストはトレミフェン(すなわち2-ヒドロキシ-1, 2, 3-プロパントリカルボン酸2-[4-(4-クロロ-1, 2-ジフェニル-1-ブテニル)フェノキシ]-N, N-ジメチルエタンアミンおよび(Z)-2-体(1:1))であり、これは米国特許第4, 99

6, 225号に開示されている(その記載が本明細書に参考として含まれるものとする)。

【0026】他の好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストはセンチュロマン(すなわち1-[2-[4-(1-メトキシ-2, 2-ジメチル-3-フェニルクロマン-4-イル)-フェノキシ]-エチル]-ピロリジン)であり、これは米国特許第3, 822, 287号に開示されている(その記載が本明細書に参考として含まれるものとする)。

【0027】他の好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストはイドキシフェン(すなわち1-[4-[1-(4-ヨードフェニル)-2-フェニル-1-ブテニル]フェノキシ]エチル]ピロリジン)であり、これは米国特許第4, 839, 155号に開示されている(その記載が本明細書に参考として含まれるものとする)。

【0028】他の好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは6-(4-ヒドロキシフェニル)-5-[4-(2-ピペリジン-1-イル-エトキシ)-ベンジル]-ナフタレン-2-オールであり、これは米国特許第5, 484, 795号に開示されている(その記載が本明細書に参考として含まれるものとする)。

【0029】他の好ましいエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストは{4-[2-(2-アザ-ビスクロ[2.2.1]ヘプト-2-イル)-エトキシ]-フェニル}-[6-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシフェニル)-ベンゾ[b]チオフェン-3-イル]-メタノンであり、これはその製造方法と共に国際特許出願公開第WO 95/10513号(ファイザー社に譲渡)に開示されている。

【0030】本発明化合物の薬剤学的に許容しうる塩類は当業者に知られており、当業者に既知の方法で調製できる。

【0031】本発明化合物の出発物質および試薬は容易に入手できるか、または通常の有機合成法により、また前記特許明細書から容易に合成できる。

【0032】本発明方法はすべて、哺乳動物、特にヒトにおいて遺伝子発現の制御によって、炎症細胞を阻止し、またはプラークを安定化することにより、療法用として適用できる。これらの機能はアテローム性動脈硬化症および冠状動脈性心臓疾患関連の障害の発生と密接に関係するので、これらの方法はアテローム性動脈硬化症を予防、停止、退行または逆行させる。

【0033】本発明化合物が哺乳動物(たとえばヒト、特に女性)においてアテローム性動脈硬化症を処置する際の医薬として有用であることは、一般的なアッセイ法および後記のインビボアッセイ法におけるこれらの化合物の活性により証明される。これらのアッセイ法は、本発明化合物の活性をそれら自体の間で、または他の既知の化合物と、比較できる手段を提供する。これらの比較

の結果は、ヒトを含めた哺乳動物においてこのような疾患を処置するための投与量を決定するのに有用である。

【0034】これらの化合物の抗アテローム性動脈硬化活性は、プラシーボ対照と比較してこれらの化合物（高脂肪飼料を与えた卵巣切除した雌ApoE欠損性マウスに皮下投与）が大動脈表面のアテローム性動脈硬化病変で覆われた割合に及ぼす影響を評価することにより判定できる。

【0035】プロトコール

動物の調製：卵巣切除した雌ApoE欠損性マウスを高脂肪飼料で飼育する。これらの動物を対照群と被験化合物群に分ける。被験化合物とプラシーボ（60日放出型の皮下ベレットに装入）を、動物の首の後の皮下にトロカールで挿入する。マウスへの合計投与期間が約90日となるように、初回投与の約55日後に動物に再投与する。

【0036】動物

雌、ApoE欠損性トランスジェニックマウス
平均体重20～30g

25日齢で卵巣切除

試験開始時に個々の隔離ケージに収容

70日齢時に90日間の投与

脂肪21重量%およびコレステロール0.15重量%を含有するウェスタン（Western）型飼料（ハーラン・テクラド（Harlan Teklad）社、ウィスコンシン州マジソン、カタログ#TD88137 TEK LAD）を、屠殺前3カ月間与えた

155日齢で屠殺

【0037】徐放性ベレット

徐放性ベレット（60日、30mm）はイノベイティブ・リサーチ・オブ・アメリカ（Innovative Research of America）社（1-800-421-8171）から入手した以下のものである：

プラシーボ：5mgのベレット（83μg/日）カタログ#SC-111、イノベイティブ・リサーチ・オブ・アメリカ（1-800-421-8171）から入手
被験化合物：ベレットカタログ#特注、イノベイティブ・リサーチ・オブ・アメリカ社（1-800-421-8171）から入手

組織採取：90日の投与期間の終了時に、動物を屠殺する前に一夜絶食させる。動物を麻酔し、血漿コレステロールおよびトリグリセリドの分析用に各動物から全血試料を採取する。マウスを原位置で短時間、または組織が血液を含まなくなるまで（灌流液が透明になる）PBSで灌流する（左心室の心臓穿刺により）。灌流液を4%カコジル酸緩衝バラホルムアルデヒドに切り換え、原位置で短時間に動物を灌流固定する。子宮を摘出し、秤量する。心臓および大動脈（心臓部の大動脈弓から腎分岐の直下まで）を摘出し、4%カコジル酸緩衝バラホルム

アルデヒドを入れた別個のバイアルに移す。組織を数時間、灌流後固定する。組織を30%ゴムスクロス（PBS中、1%アラビアゴム+30%スクロス）に移し、切断前に少なくとも1日間、スクロスを組織に浸潤させる。

【0038】**大動脈：**大動脈から外膜を取り除き、大動脈弓から始めて大腿分岐まで前進して大動脈の側面に沿って縦方向に切込むことにより、血管を切開する。大動脈弓の他方側に第2の縦方向切込みを入れて、この位置で血管を半分に裂く。たとえばOPTIMAS画像分析プログラム[OPTIMAS4.1ソフトウェア（イメージ・プロセッシング・ソリューション（Image Processing Solution）社、マサチューセッツ州ウーバン）]を用いて、大動脈の病変の程度を定量する。大動脈を10%緩衝ホルマリン中に保存する。

【0039】**心臓：**心臓をOCT包埋用媒質（オプティマル・クリオスタット・テンパラチャー（Optimal Cryostat Temperature）社）に包埋し、心臓の大動脈洞および大動脈弁のクリオスタット切片を作成する。10μmずつの切片を採取し、切片を一枚おきにベクタボンド（Vectabond、ベクター・ラボラトリーズ社、カリフォルニア州バーリングゲイム）コーティングしたスライド上に保存する。大動脈の各領域に約3～4枚のスライド（スライド1枚につき切片約4枚）とする。オイル・レッドO（Oil Red O）でこれらの心臓切片の脂質を染色し、OPTIMAS画像分析プログラムを用いて大動脈洞および/または大動脈弁領域の病変の程度を定量する。

【0040】本発明化合物の投与は、本発明化合物を全身に送達するいかなる方法によってもよい。これらの方法には、経口、非経口、十二指腸内などの経路が含まれる。一般に本発明化合物は経口投与されるが、たとえばその標的に経口投与が不適切である場合や患者が薬剤を経口摂取できない場合には非経口投与（たとえば静脈内、筋肉内、皮下または脊髄内）も採用できる。本発明化合物は単独投与するか、または同時にしくは任意の順序で併用することができる。

【0041】いずれの場合でも、化合物（1種またはそれ以上）の投与量および投与時期はもちろん、処置される対象、疾患の程度、投与方式および担当医の判断に依存する。したがって、患者ごとに変動するので、以下に挙げる用量は指針であって、医師が個々の患者に適切であると考えた活性（すなわち抗アテローム性動脈硬化作用）を達成する薬物用量を決定するであろう。目的とする活性の程度を考慮する際に、医師はアテローム性動脈硬化症の開始時水準、患者の年齢および他の疾患（たとえば骨粗しょう症）の存在など、多数の要因のバランスをとらなければならない。たとえばエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストの投与は、特に閉経後の女性にと

って骨粗しょう症に対し有益となるであろう。以下の節に、本発明の種々の化合物につき好ましい用量範囲を示す。

【0042】本発明化合物の使用量は、抗アテローム性動脈硬化薬としてのその活性により決定される。この活性は、前記プロトコルを用いて、個々の化合物の薬物動態、ならびにプラークの形成および/または安定化に有効な最低最高用量により決定される。

【0043】一般に本発明化合物につき本発明の抗アテローム性動脈硬化活性に有効な量は0.01~200mg/kg/日、好ましくは0.10~100mg/kg/日である。

【0044】本発明化合物は一般に、本発明化合物少なくとも1種および薬剤学的に許容しうる賦形剤または希釈剤を含む薬剤組成物の形で投与される。したがって本発明化合物は単独で、または一緒に、慣用される任意の経口、非経口または経皮剤形で投与できる。

【0045】経口投与のためには、薬剤組成物は液剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤などの形をとることができる。クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウムおよびリン酸カルシウムなど種々の賦形剤を、種々の崩壊剤、たとえばデンプン（好ましくはバレイショデンプンまたはタビオカデンプン）および特定の複合ケイ酸塩、ならびに結合剤、たとえばポリビニルピロリドン、白糖、ゼラチンおよびアラビアゴムと共に含有する錠剤を使用する。さらに、滑沢剤、たとえばステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルクが、錠剤成形のためにしばしばきわめて有用である。同様な種類の固体組成物が、軟および硬一充填ゼラチンカプセル内の充填物としても用いられる。これに関して好ましい物質には、乳糖および高分子量ポリエチレングリコールも含まれる。水性懸濁剤および/またはエリキシル剤が経口投与のために好ましい場合は、本発明化合物を種々の甘味剤、矯味矯臭剤、着色剤、乳化剤および/または沈殿防止剤、ならびに希釈剤、たとえば水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリンおよびその種々の組合わせと組み合わせることができる。

【0046】非経口投与のためには、ゴマ油もしくは落花生油中、またはプロピレングリコール水溶液中の液剤、および対応する水溶性塩類の無菌水溶性を使用できる。このような水溶液を必要ならば適切に緩衝化し、液体希釈剤を十分量の塩類溶液またはブドウ糖でまず等張にしてもよい。これらの水溶液は静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内注射用として特に適している。これに関して、使用する無菌水性媒質は当業者に周知の標準法によりすべて容易に得られる。

【0047】経皮（たとえば局所）投与のためには、他の点では上記の非経口液剤と同様な低濃度の無菌水溶液または部分水溶液（通常は約0.1~5%濃度）を調製する。

【0048】一定量の有効成分を含有する種々の薬剤組成物の調製法は既知であるか、または本明細書の記載からみて当業者に自明であろう。薬剤組成物の調製法の例については、Remington's Pharmaceutical Sciences, マーク・パブリッシング・カンパニー、ペンシルベニア州イースター、第15版（1975）を参照されたい。

【0049】本発明の薬剤組成物は、本発明化合物（1種またはそれ以上）0.1~95%、好ましくは1~70%を含有しうる。いずれの場合も、投与する組成物または配合物は処置される対象の疾患/状態を処置するのに有効な量の本発明化合物（1種またはそれ以上）を含有するであろう。

【0050】

【実施例】

実施例1

この実施例は、高脂肪飼料を与え、ブラシーボ、17 β -エストラジオール、または{4-[2-(2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-2-イル)-エトキシ]-フェニル}-[6-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシフェニル)-ベンゾ[b]チオフェン-3-イル]-メタノンを90日間皮下投与した、卵巣切除した雌Apoe欠損性マウスにみられたアテローム性動脈硬化病変の程度を比較する。

【0051】動物

ホモ接合アポリポタンパク質(apo)E-欠損性マウスを自社で繁殖させた。このマウスは混合遺伝子背景をもっていた(129olac57B/6)。36匹のマウスを12時間の明/暗サイクルの室内で、飼料と水を任意に摂取させて飼育した。マウスにはカロリー調整した“ウェスタン型”飼料(ハーラン・テクラド社、ウィスコンシン州マジソン、カタログ#TD88137、脂肪21重量%およびコレステロール0.15重量%を含有)を与えた。離乳時に(28日齢)、雄マウスの両側の卵巣を摘出し(OVX)、または1cmの背面切開により擬似手術を行った。45日齢時にマウスをランダムに3つの処理群のうちの1つに帰属させ、60日の徐放性ペレット(イノベイティブ・リサーチ・オブ・アメリカ社、オハイオ州トレド)を麻酔下に肩甲骨間に挿入した:0.5mgのブラシーボ、6 μ g/日の17 β -エストラジオール、または50 μ g/日の{4-[2-(2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-2-イル)-エトキシ]-フェニル}-[6-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシフェニル)-ベンゾ[b]チオフェン-3-イル]-メタノン。55日後にマウスに再投与して、合計投与期間90日となるようにした。

【0052】組織調製

マウスを一夜絶食させたのち、ケタミン/キシラジン/PLBS 1:1:2(マイルズ社)で麻酔した。次いで血液および尿を除去し、リン酸緩衝塩類溶液(PB

S) pH 7.4により原位置で灌流した(80 mm² h g)。

【0053】以下に従って脂質染色および体型測定分析用の切片を調製した。心臓を原位置で4%カコジル酸緩衝パラホルムアルデヒドにより灌流固定した。心臓および大動脈を摘出し、さらに2~3時間、4%カコジル酸緩衝パラホルムアルデヒド中で固定し、次いで4℃で24時間、30%ゴムスクロス(PBS中、1%アラビアゴム+30%スクロス)を浸潤させた。断面病変面積を測定するために、心臓をOCT包埋用媒質(オプティマル・クリオスタット・テンパラチャー社)に包埋し、-18℃で10μmのクリオスタット切片を作成した。切片を一枚おきにベクタボンド(ベクター・ラボラトリーズ社、カリフォルニア州バーリンゲイム)コーティングしたスライド上に封入した。切片作成する心臓領域を、マウスのアテローム性動脈硬化病変の定量に一般に用いられる2つの別個の領域、すなわち大動脈洞と大動脈弁に分割した。心臓基底部から上方へ移動すると、内腔を3つの別個の領域に分割する心臓弁膜尖が最初に見えた位置で洞が始まる。この領域の大動脈壁は膨らみ、不規則である。心臓弁膜尖がもはや内腔を分割しなくなると洞領域が終わって弁領域が始まり、壁はさらに丸く、識別できるようになる。洞が終わる位置で弁が始まり、心臓弁膜尖がもはや認識できなくなって壁が十分に丸くなる(約280μm)まで続く。オイル・レッドO(プロビレングリコール中0.5%、ポリサイエンティフィック(Polyscientific)社、ニューヨーク州ベシヨア)で切片の脂質を染色し、ギルII(Gill's III)ヘマトキシリン(シグマ社)で対比染色した。

【0054】病変の分析

大動脈洞および大動脈弁の各切片をオイル・レッドO染色領域につき、ライツ・レイバールクス(Leitz Laborlux)S(ライカ社)光学顕微鏡に接続したカメラから画像を直接に捕らえてトリニトロン(Trinitron)RGBモニター上に表示することにより評価した。画像分析はOPTIMAS4.1ソフトウェア(イメージ・プロセッシング・ソリューション社、マサチューセッツ州ウーバン)を用いて行った。大動脈壁断面の外縁および内縁の輪郭が描き出された。正常組織(ヘマトキシリン染色)と病的組織(オイル・レッドO染色)とを区別できるように閾値を設定した。結果を、各切片についての病変の大きさの平均として、すなわち

血管壁の全断面積(各切片の正常+病的面積、内腔を除く)に対するオイル・レッドO染色面積の%として表した。各動物につき平均12~16枚の切片を測定し、データを病変の大きさまたは病変面積の平均%として表示する。

【0055】大動脈表面の病変で覆われた割合を正面標本により測定した。前記のようにゴムスクロスを浸潤させた大動脈から外膜を取り除き、大動脈弓から大腿分岐まで縦方向に切込みをいれた。大動脈弓に冠状動脈と頸動脈の間で第2の縦方向切込みをいれ、大動脈をポリスチレン片上に広げた。各大動脈をコピースタンドに取り付けたCCDカメラから直接捕らえた画像により病変領域につき評価し、トリニトロンモニター上に表示した。染色していない組織の病変領域をOPTIMAS4.1画像分析により測定した。外膜を取り除いた大動脈のアテローム性動脈硬化プラークの領域は黄白色領域として見える。この面積を、黒色(バックグラウンド)、灰色(正常組織)および白色(病変領域)の色彩につき手動で閾値設定することにより定量した。

【0056】血漿脂質

全血漿コレステロールおよびトリグリセリドを、市販のキット(ワコーおよびベーリンガー・マンハイム社)を用いた比色法により測定した。

【0057】統計学的分析

分散分析法(ANOVA)により血漿脂質および病変の大きさに関してグループ間の統計学的有意差を調べた。フィッシャーF試験により平均間の有意差を判定した。

【0058】結果

この実施例の結果を次表に詳述する。これらのデータは、エストロゲンアゴニストである{4-[2-(2-アザービシクロ[2.2.1]ヘプト-2-イル)-エトキシ]-フェニル}-[6-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシフェニル)-ベンゾ[b]チオフェン-3-イル]-メタノンにつきアテローム性動脈硬化病変の減少を証明する。この実験ではエストロゲンアゴニストのコレステロール低下活性がみられなかったため、病変の減少はコレステロール減少なしに起こったという点が重要である。これは、この化合物を経口投与ではなく皮下投与したためか、またはマウスが脂質の作用に関してエストロゲン様化合物に対し非応答性であるためである。

【0059】

【表1】

4-[2-(2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-2-イル)-エトキシ]-フェニル}-[6-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシフェニル)-ベンゾ[b]チオフェン-3-イル]-メタノンが血漿脂質または子宮重量に影響を及ぼすことなく卵巣摘出apoe⁻欠損性マウスの病変面積を減少させる作用

群	N	全コレ ステロール (mg/dl)	トリ グリセリド (mg/dl)	子宮 重量 (g)	大動脈弁 病変面積 (%)
ブラシーボ	15	829±315	96±24	37±39	33.4±11.2
17β-エストラジオール (8 μg/d)	8	841±172*	53±24*	165±105*	18.9±5.2*
X (50 μg/d)	10	820±134	91±55	35±15	21.2±6*

* ブラシーボと有意差がある (p<0.05)

Xは4-[2-(2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-2-イル)-エトキシ]-フェニル}-[6-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシフェニル)-ベンゾ[b]チオフェン-3-イル]-メタノンである

【0060】本発明は以上に述べた特定の態様に限定されるべきではなく、特許請求の範囲に定めた本発明の精神および範囲から逸脱することなく多様な変更や修正をなしうると解すべきである。